



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för kliniska vetenskaper

Chromogranin A i blod och i saliv hos hundar

Ellen Byström

*Uppsala
2014*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2014:7*

Chromogranin A i blod och i saliv hos hundar

Chromogranin A in blood and saliva in dogs

Ellen Byström

Handledare: Ann Pettersson, institutionen för kliniska vetenskaper

Biträdande handledare: Odd Höglund, institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Ragnvi Hagman, institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2014

Delnummer i serie: Examensarbete 2014:7

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: hund, chromogranin A, salivinsamling, stressmarkör, prognostisk biomarkör, beteende, normalvariation

Key words: dog, chromogranin A, saliva sampling, stressmarker, indicator of prognosis, behavior, normal variation

SAMMANFATTNING

Chromogranin A (CgA) är ett protein som finns i chromaffinceller i binjuremärgen och sympatiska nervändar. CgA frisätts tillsammans med adrenalin och noradrenalin, transmittorsubstans i sympatiska nervsystemet, genom exocytos, vid ökad sympatikusaktivitet. Det finns studier som tyder på att en produktion av CgA kan ske även i spottkörtlarna. CgA koncentrationen i blodet har hos människa visat sig vara en känslig biomarkör för att förutsäga mortaliteten hos patienter med olika livshotande tillstånd. CgA-nivåer i saliv har också visat sig vara en möjlig markör för psykologisk stress.

CgA har även hos hundar påvisats i flera olika neuroendokrina vävnader och neuroendokrina tumörer. CgA koncentrationer är mätbara i både blod och saliv hos hund, men korrelationen mellan CgA koncentrationer i blod och saliv har inte tidigare studerats. På humansidan finns det både studier som har påvisat och studier som inte har påvisat någon korrelation mellan CgA koncentrationer i blod och saliv. Hypotesen som prövades i detta arbete var om det finns en korrelation mellan CgA-nivåer i blod och saliv hos hund. Dessutom ville vi undersöka om CgA-nivåerna varierar under dygnet hos friska hundar. Ytterligare ett syfte med denna studie var att utpröva en enkel icke invasiv metod för insamling av saliv och utvärdera huruvida salivinsamling innebär ett mindre stressmoment för hunden jämfört med blodprovstagning. Om metoden fungerar skulle djurägaren kunna ta prover från sin hund i hemmamiljö.

Blodprov och salivinsamling skedde från fem treåriga beagletikar utan kända sjukdomar, fyra gånger per dag under tio dagar. Provtagning skedde innan och efter utfodring samt innan och efter promenad/studentövning. Innan varje provtagningstillfälle studerades hundarnas beteende och noterades i ett deskriptivt beteendeprotokoll.

Den salivinsamlingsmetod som visade sig vara den bästa var att placera en polyeterskumsvamp i munnen, buckalt på bäge sidor kaudalt om överkäkens fjärde premolar. Hundarna verkade uppleva salivinsamling som ett större obehag än blodprovstagning och endast 95 av 200 salivprover gick att analysera på grund av otillräcklig salivmängd eller för högt mukusinnehåll. Denna salivinsamlingsmetod är därför inte att rekommendera för vidare studier av CgA.

Ingen korrelation mellan nivåerna av CgA i blod och saliv kunde påvisas ($p = 0,075$). Medelvärde \pm standardavvikelse för CgA koncentrationerna i blod respektive saliv var $0,93 \pm 0,20$ respektive $0,84 \pm 0,36$ nmol/L. Inga signifikanta skillnader i CgA-nivåer i plasma mellan de olika provtagningstillfällena ($p > 0,69$) kunde påvisas. Däremot var CgA koncentrationerna i saliv signifikant högre vid dagens första provtagningstillfälle, innan utfodring, jämfört med övriga provtagningstillfällen ($p < 0,008$).

SUMMARY

Chromogranin A is a protein stored in the adrenal chromaffin cells and in the sympathetic nerve endings. CgA is co-released with the sympathetic neurotransmitters epinephrine and norepinephrine, by exocytosis, in response to an increased activity of the sympathochromaffin system. There are studies implying that a production of CgA also can occur in the salivary glands. Plasma CgA concentrations have been shown to be a useful marker of prognosis in critically ill patients. Salivary CgA concentrations have also been shown to be a possible index for evaluating psychological stress.

CgA has also been identified in different neuroendocrine tissues and neuroendocrine tumors in dogs. CgA concentrations in dogs can be measured in both blood and saliva. However, the correlation between the concentration of CgA in blood and saliva has previously not been studied in dogs. There are both studies that have shown a correlation between the CgA concentrations in blood and saliva in humans and studies that have not been able to demonstrate a correlation. The hypothesis that was tried in this study was that CgA concentrations in blood and saliva correlate in dogs. Further, our aim was to study if CgA concentrations in blood and saliva vary during the day in healthy dogs. A second aim of this study was to design a non invasive saliva sampling method and evaluate if dogs experience saliva sampling as less stressful compared to blood sampling. Saliva sampling could be a future method for sampling for CgA in a home environment.

Blood and saliva were collected from five healthy three years old beagle dogs (all females), four times a day for ten days. Sampling occurred before and after feeding and before and after walking/participating in a student exercise. Each dog's behavior was studied and recorded in a behavior protocol before each sample collection.

The best saliva sampling method appeared to be a synthetic sponge, placed buccally and caudal to the fourth premolar (P4) on both sides of the mouth. The dogs seemed to experience saliva sampling as more unpleasant than blood sampling. Further, only 95 of 200 saliva samples could be analyzed as a due to insufficient volume or too high mucus content. As a result of this, the saliva sampling method is not recommended to be used for further studies of CgA in dogs.

No correlation was found between the CgA concentration in blood and saliva ($p = 0,075$). The mean values \pm standard deviation were $0,93 \pm 0,20$ nmol/L for CgA concentration in blood and $0,84 \pm 0,36$ nmol/L for CgA concentration in saliva. No statistically significant differences could be found in plasma CgA concentration between the different sample collections ($p > 0,69$). Saliva CgA concentration in the morning, before feeding, was statistically significantly higher ($p < 0,008$) compared to the other samples during the day.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

INLEDNING	1
LITTERATURGENOMGÅNG	3
Allmänt om chromogranin A	3
Analysmetoder för chromogranin A.....	4
Variation under dygnet.....	5
Chromogranin A och fysisk träning	5
Korrelation chromogranin A i blod och saliv.....	6
Användbarheten för chromogranin A som en prognostisk markör	6
Chromogranin A hos svårt sjuka patienter	6
Chromogranin A och hjärt-kärlsjukdom	7
Chromogranin A och neuroendokrin neoplasi	8
Chromogranin A och parodontit	9
Chromogranin A och psykologisk stress.....	9
Andra orsaker till förhöjda nivåer av chromogranin A	9
Salivsammansättning.....	10
MATERIAL OCH METODER	10
Utformning av salivinsamlingsmetod	11
Salimetrics oral swab® (SOS)	11
Salimetrics oral swab® utan hölje.....	11
Bomullssvabb	11
Tvättork gasväv	12
Badsvamp	12
Utvärdering av chromogranin A-nivåer i blod och saliv.....	13
Utformning av provtagning.....	14
Utformande av beteendeprotokoll	15

Gruppering efter beteende	16
Analys av blod- och salivprover.....	17
Statistiska metoder	17
RESULTAT	18
Genererad salivmängd med olika salivinsamlingsmetoder	18
Statistisk analys	18
Chromogranin A-nivåer i blod och saliv	18
Nivåer av chromogranin A vid de olika provtagningstillfällena.....	19
Individuell variation av chromogranin A	21
Chromogranin A-nivåer och hundens olika beteenden	22
Korrelation mellan chromogranin A-nivåer i blod och saliv	23
DISKUSSION	23
Utformning av beteendeprotokoll	23
Salivinsamling.....	24
Korrelation mellan chromogranin A i plasma och saliv samt variation av chromogranin A över dygnet	25
Individuell variation av chromogranin A	26
Chromogranin A-nivåer och olika beteenden	26
Chromogranin A-nivåer och stress.....	26
Chromogranin A som prognostisk biomarkör.....	27
TACK.....	29
REFERENSER	29
BILAGA 1	1

INLEDNING

Vi har idag mycket stora möjligheter att behandla olika livshotande tillstånd hos hund och det finns ett stort behov av att tidigt i ett behandlingsskede kunna bedöma prognosen för att undvika onödigt lidande för patienten, i form av behandlingar som ändå inte kommer att påverka hundens livslängd. Idag forskas det mycket kring olika biomarkörer för att ställa diagnos och bedöma prognos. Analys av chromogranin A (CgA) koncentrationer i blod har på humansidan visat sig vara användbar som en känslig biomarkör för att förutsäga mortaliteten hos patienter med olika livshotande tillstånd (Zhang *et al.*, 2008), vid grava brännskador (Lindahl *et al.*, 2012), allvarlig sepsis (Røsjø *et al.*, 2012), kronisk hjärtsvikt (Ceconi *et al.*, 2002) och akuta koronarkärlssyndrom (Jansson *et al.*, 2009). CgA koncentrationer har också visat sig vara en möjlig markör för psykologisk stress (Nakane *et al.*, 1998; Nakane *et al.*, 2002; Miyakawa *et al.*, 2006; Takatsuji *et al.*, 2008). Frisättning av CgA sker från binjuremärgen (O'Connor & Bernstein, 1984; Takiyyuddin *et al.*, 1990), sympatiska nerver (O'Connor & Bernstein, 1984), men även från andra organ såsom spottkörtlarna (Kanno *et al.*, 1999; Saruta *et al.*, 2005; Dag *et al.*, 2010). Studier har visat att CgA frisätts vid ökad sympatikusaktivitet (O'Connor & Bernstein, 1984; Takiyyuddin *et al.*, 1990; Cryer *et al.*, 1991; Kanno *et al.*, 1999). CgA-koncentrationen i plasma kan även reflektera sympatikus-binjureaktiviteten hos hundar (Akiyoshi *et al.*, 2005).

CgA koncentrationer är mätbara i både blod (Akiyoshi *et al.*, 2005) och saliv hos hund (Kanai *et al.*, 2008). Om det finns en korrelation mellan nivåer av CgA i blod och saliv har dock inte tidigare undersökts hos hund. Det finns humanstudier som har påvisat en positiv korrelation mellan nivåerna av CgA i blod och saliv (Dag *et al.*, 2010), dessutom såg Reshma *et al* (2013) inga signifikanta skillnader i CgA-nivåer mellan blod och saliv. Den *et al* (2007) såg däremot ingen korrelation mellan nivåerna av CgA i blod och saliv.

Salivprovtagning utgör en icke invasiv mätmetod som skulle kunna vara användbar i kliniken. Salivinsamling, i jämförelse med blodprovstagnning, skulle kunna ha fördelarna att:

- vara enklare att utföra på kliniken
- utföras av djurägaren i hemmamiljö
- innebära ett minskat lidande för djuret
- vara mindre kostsamt för djurägaren

Till författarens kännedom finns idag ingen utvärderad metod för icke invasiv salivinsamling på hund. Första steget i denna studie blir därför att utforma och utvärdera en lämplig metod för salivinsamling på hund och som kan användas för analys av CgA. Metoden bör innebära minimal stress för djuret eftersom stress i sin tur kan påverka CgA-utsöndringen. Minst 200 µml saliv krävs för analysen. För detta ändamål ska fyra olika metoder utvärderas (se nedan).

Hypotesen som ska prövas i detta examensarbete är att nivåerna av CgA i blod och saliv korrelerar med varandra hos hund. Syftet med examensarbetet är också att se vilka CgA-nivåer som kan förväntas hos hundar under normala levnadsvillkor. Denna studie är väsentlig för att lägga grunden för framtida studier rörande användbarheten av CgA koncentrationer i saliv som en prognostisk biomarkör hos hund.

LITTERATURGENOMGÅNG

Allmänt om chromogranin A

Det finns idag få studier utförda om CgA på djur. Om inte annat specificeras i texten nedan, refereras det till en humanstudie.

CgA är ett lösligt, 66 kDa (humant) protein (Banks & Helle, 1965; O'Connor *et al.*, 1984; Saruta *et al.*, 2005). CgA hos hundar väger 68 kDa och har en 83,3 % överensstämmelse i de första tolv aminosyrasekvenserna med humant CgA (Akiyoshi *et al.*, 2005). CgA finns i både binjuremärgen (i chromaffinceller) och sympatiska nerver. Binjuremärgen tycks innehålla mer CgA än sympatiska nerver och Takiyyuddin *et al* (1990) visade i sina in vitro-studier att binjuremärgen innehöll 97 gånger mer CgA än sympatiska nerver. Giampaolo *et al* (2002) såg dock en signifikant ökning av CgA-nivåerna på eftermiddagen även hos människor där båda binjurarna var bortopererade, vilket tyder på att binjurarna inte är huvudkällan till produktionen av CgA.

Förhöjda nivåer av CgA har också setts vid neuroendokrina tumörer (O'Connor & Deftos, 1987; Nobels *et al.*, 1997; Campana *et al.*, 2007; Paik *et al.*, 2013).

Även hundar har CgA i flera olika neuroendokrina vävnader och neuroendokrina tumörer. CgA kan ses i de vävnader som har en peptidhormon- eller katecholaminproduktion. Däremot skiljer sig mängden intracellulärt CgA mellan de olika vävnaderna. De tumörer som har det största innehållet av CgA är pheochromocytom och chemodectom (Doss *et al.*, 1998).

Förhöjda nivåer av CgA har setts vid sympatikusaktivering (O'Connor & Bernstein, 1984; Takiyyuddin *et al.*, 1990; Cryer *et al.*, 1991; Kanno *et al.*, 1999). Frisättningen av CgA är beroende av kalcium och CgA frisätts tillsammans med katecholaminer (adrenalin och noradrenalin) via exocytos (Smith & Kirshner, 1966; Takiyyuddin *et al.*, 1990). CgA och katecholaminer frisätts tillsammans vid stimulering av binjuren vid till exempel hypoglykemi (orsakad av insulininjektion) (Takiyyuddin *et al.*, 1990; Giampaolo *et al.*, 2002), men inte vid stimulering av glukagon eller svag aktivering av sympatikus (Giampaolo *et al.*, 2002). Cryer *et al* (1991) visade en signifikant korrelation mellan CgA koncentrationer och noradrenalin vid kraftig sympatikusaktivering (hjärtstillestånd), men att CgA koncentrationer inte var en känslig markör för sympatikusstimulering under fysiologiska förhållanden, vilket även Takiyyuddin *et al* (1990) visade i sin studie. CgA-nivåer ökar vid insulininducerad hypoglykemi även hos hundar och nivåerna förblir förhöjda under en längre tid jämfört med katecholaminer och kortisol. Noradrenalin-nivåerna var signifikant förhöjda från 30 till 40 minuter efter insulingiva, nivåerna av adrenalin och kortisol från 20 till 60 minuter, medan CgA-nivåerna var signifikant förhöjda från 30 till 120 minuter efter insulingiva (Akiyoshi *et al.*, 2005).

Noradrenalin och adrenalin, transmittorsubstanser i sympatiska nervsystemet, stiger vid stress (Ehlert & Straub, 1998). CgA har en halveringstid på 18,4 minuter (O'Connor & Bernstein, 1984), medan noradrenalin har en halveringstid på $2 \pm 0,4$ minuter (Esler *et al.*, 1981). Då CgA förblir intakt under en längre tid i cirkulationen jämfört med adrenalin och noradrenalin, kan CgA-nivåer därför vara en bättre indikator för akut stress (Takiyyuddin *et al.*, 1990; Kanno *et al.*, 1999; Akiyoshi *et al.*, 2005). Humana studier har också visat att kroppspositionen påverkar nivåerna av katecholaminer. Nivåerna av katecholaminer steg efter att personerna befunnit sig i stående position, medan nivåerna av CgA förblev oförändrade (Takiyyuddin *et al.*, 1990; Giampaolo *et al.*, 2002). CgA är också mycket stabil och varken inkubering i 25°C eller preinkubering i 37°C i två timmar påverkar nivåerna av CgA jämfört med inkubering i 4°C (O'Connor & Frigon, 1984). Det tar längre tid för CgA-nivåer att stiga än för adrenalin. Vid insulininducerad hypoglykemi nådde adrenalin sin högsta nivå efter 30–60 minuter, medan CgA nådde sin högsta nivå först vid 90–120 minuter (Takiyyuddin *et al.*, 1990; Giampaolo *et al.*, 2002).

Produktion av CgA sker även i submandibularspottkörtlarna hos människa (Kanno *et al.*, 1999; Saruta *et al.*, 2005). CgA har framförallt påvisats i de serösa och duktala cellerna och inte i de mukösa och uttryck av CgA-genen skedde i de serösa cellerna. CgA i saliven produceras troligen i submandibularspottkörtlarna, och inte i binjuremärget, då CgA har påvisats i salivmatrix i lumen på de duktala cellerna (Saruta *et al.*, 2005). Även Dag *et al* (2010) påvisade en produktion av CgA i spottkörtlarna. Kanno *et al* (1999) visade i sin studie en ökad produktion i saliven vid stimulering av acetylcholin och/eller noradrenalin.

Ingen signifikant skillnad i CgA-nivåer i blod har observerats mellan män och kvinnor (Hsiao *et al.*, 1990; Campana *et al.*, 2007; Jansson *et al.*, 2008). Likaså har ingen skillnad i CgA-nivåer setts mellan tikar och hanhundar, varken i plasma eller i saliv (Akiyoshi *et al.*, 2005; Kanai *et al.*, 2008). Jansson *et al* (2009) visade i sin studie högre nivåer av CgA hos äldre personer jämfört med yngre, medan andra studier inte har visat något signifikant samband mellan CgA-nivåer och ålder (Hsiao *et al.*, 1990; Campana *et al.*, 2007).

Analysmetoder för chromogranin A

Det finns idag flera olika kommersiella analysmetoder på humansidan för CgA koncentrationer. Stridsberg *et al* (2003) jämförde tre metoder som då fanns på marknaden; CGA-RIA CT¹, DAKO Chromogranin A ELISA kit² och CgA EuroDiagnostica³. Dessa tre har olika uppbyggnad, där CGA-RIA CT använder sig av monoklonala antikroppar, medan de andra två använder sig av polyklonala antikroppar. Olika standardisering används i de olika metoderna. I studien ingick 77 patienter varav 46 var diagnostiserade med en neuroendokrin tumör. Studien visade att

¹ CIS Bio International S.A, Route Nationale 306 BP 32 Cedex, Gif-sur-yvette, 91192 Frankrike

² DAKO A/S, Produktionsvej 42 DK-2600 Glostrup, Danmark

³ EuroDiagnostica AB, Lundavägen 151, 21224 Malmö

specificiteten och sensitiviteten varierade mellan dessa tre analysmetoder där CGA-RIA hade den högsta specificiteten (96 %) och CgA EuroDiagnostica hade den högsta sensitiviteten (93 %).

I en nyligen utförd studie undersöktes vilka metoder som kan användas för analys av CgA koncentrationer hos hund och katt. De metoder som studerades var fem olika regionspecifika kompetativa analysmetoder, där olika sektioner av CgA-moleylen analyseras, en metod som mäter secretoneurin (SN), en del av CgA-molekylen, samt CgA EuroDiagnostica⁴, som analyserar hela CgA-molekylen. För både hund och katt stämde aminosyrasekvensen hos CgA17-38 (vasostatin) till 100 % överens med människa, vilket också gällde för SN. Även CgA361-372 (catestatin) hade en hög överensstämmelse mellan människa, hund och katt. CgA EuroDiagnostica kunde inte användas för att mäta CgA koncentrationer hos hundar och katter (Stridsberg, M., M.D., Ph. D klinisk kemi, pers.medd., 2013).

Variation under dygnet

Studier på humansidan tyder på att det finns en fysiologisk variation av CgA-nivåer i saliv under dygnet. I en studie samlades blod- och salivprover från 40 manliga studenter över dygnet (provtagning skedde kl 7:00–22:30). De högsta nivåerna av CgA i saliv sågs sent på kvällen (kl 22:30) och på morgonen direkt när personerna hade vaknat (kl 7.00) och sjönk redan en timme senare. Nivåerna förblev låga hela dagen för att sedan stiga igen vid sista provtagningen. Ingen signifikant skillnad i plasmanivåer av CgA under dygnet kunde dock påvisas (Den *et al.*, 2006). Däremot såg Giampaolo *et al* (2002) en cirkadisk rytm hos CgA-nivåer i blod, med de högsta nivåerna av CgA på kvällen (kl 23:00) och de lägsta på morgonen (kl 8:00). Provtagning skedde mellan kl 8:00 och 23:00. Takiyyuddin *et al* (1991) visade i sin studie en variation i CgA-nivåer i plasma under en åttatimmars period (kl 9:00–17:00), där blodprov togs var tionde minut. Däremot visade studien inga skillnader i CgA-nivåer när blodprov togs var tredje timme under ett dygn. Inte heller någon signifikant variation av nivåerna av CgA i plasma sågs mellan dagarna.

Nivåerna av CgA i blod respektive saliv har även studerats på hundar. I en studie studerades tio friska beaglar (fem hanhundar och fem tikar) från vilka blodprov togs var sjätte timme under totalt 24 timmar. Ingen signifikant skillnad i CgA-nivåer i blod sågs i denna studie (Akiyoshi *et al.*, 2005). I en studie av Kanai *et al* (2008) samlades saliv från 16 beaglar med fyra timmars mellanrum under hela dygnet i totalt tre dygn. Denna studie kunde inte påvisa några signifikanta skillnader i CgA-nivåer i saliv under dygnet.

Chromogranin A och fysisk träning

Studier har visat motsägelsefulla resultat när det gäller hur kort- respektive långvarig träning inverkar på nivåerna av CgA. Røsjø *et al* (2013) såg inga signifikanta skillnader i CgA-nivåer i

⁴ Euro Diagnostica AB, Lundavägen 151, 21224 Malmö

plasma efter utförd kort, intensiv träning. Den långa, intensiva träningen pågick under sju dagar och plasmanivåerna av CgA ökade gradvis och var signifikant förhöjda dag sju. Inte heller Nakane *et al* (1998) såg någon skillnad i CgA-nivåer, varken i plasma eller i saliv, efter avslutad kortvarig, högintensiv cykelträning. En annan studie visade på motsatta resultat. Kortvarig, högintensiv dynamisk träning resulterade i en liten, men signifikant, ökning av CgA-nivåer i plasma, medan förlängd, lågintensiv dynamisk träning inte resulterade i någon ökning av CgA-nivåer (Takiyuddin *et al.*, 1990).

I en studie hade normalviktiga löpare, efter att ha genomfört ett maratonlopp, förhöjda serumnivåer av CgA och dessa förblev förhöjda även 24 timmar senare. Däremot sågs ingen signifikant skillnad i nivåerna av CgA före och efter loppet hos de överviktiga löparna. En signifikant korrelation kunde påvisas mellan nivåerna av CgA och löparnas sluttid, där de med kortast löptid hade de högsta nivåerna av CgA. Samtliga hade genomgått ett tio veckor långt träningsprogram innan loppet. Studien visade ingen association mellan CgA-nivåer och hjärtpåverkan, ökningen av CgA koncentrationerna berodde sannolikt på den generella katecholamin-inducerade stress som ett maratonlopp innebär (Nickel *et al.*, 2012).

En studie undersökte vilken påverkan en skogspromenad har på CgA-nivåer i saliv. CgA-nivåerna var signifikant förhöjda direkt efter promenaden jämfört med innan. Studien visade en signifikant positiv korrelation mellan nivåerna av CgA och att känna sig upplyft. Hjärtfrekvensen och trötthetskänslan ökade efter promenaden, vilket tyder på att promenaden var en fysisk stressfaktor, men det fanns ingen korrelation mellan CgA-nivåer och hjärtfrekvens eller känslan av trötthet. Då kontrollgruppen i studien bestod av samma personer som istället spenderade hela dagen på sitt kontor går det inte att uttala sig om huruvida ökningarna av CgA-nivåer berodde på att det var just en skogspromenad eller endast på grund av att det var en fysisk aktivitet (Toda *et al.*, 2013).

Korrelation chromogranin A i blod och saliv

På humansidan såg Dag *et al* (2010) en positiv korrelation mellan nivåerna av CgA i blod och saliv och Reshma *et al* (2013) såg inga signifikanta skillnader mellan nivåerna av CgA i blod och saliv. Den *et al* (2007) såg däremot ingen korrelation mellan nivåerna av CgA i blod och saliv.

Användbarheten för chromogranin A som en prognostisk markör

Chromogranin A hos svårt sjuka patienter

CgA koncentrationer har visat sig vara en bra prognostisk biomarkör för prognos hos allvarligt sjuka patienter. I en studie på Uppsala Universitetssjukhus deltog 51 patienter med minst tioprocentiga brännskador. Nivåerna av CgA i plasma skiljde sig mellan patienterna: två tredjedelar av patienterna hade en mycket liten variation i CgA-nivåer, medan en tredjedel hade en större variation. De patienter som uppvisade störst variation hade också de högsta CgA-nivåerna. De patienterna var äldre, hade mer utbredda brännskador och utsattes för fler

operationer under de första sju dagarna. Denna tredjedel hade också en sämre organfunktion vid dag sju. Ingen korrelation mellan storleken på brännskadorna och CgA-nivåerna kunde påvisas, däremot fanns det en korrelation mellan CgA-nivåer och brännskadans utbredning på djupet: ju djupare brännskada, desto högre nivåer av CgA. Enstaka höga CgA-värden i plasma visade sig vara bra prediktorer för organdysfunktion en vecka efter att brännskadan uppstod. CgA koncentrationerna i plasma var en bättre prediktor för organdysfunktion än brännskadans totala procentutbredning (Lindahl *et al.*, 2013).

I en annan studie ingick 232 personer som utvecklat allvarlig sepsis och blodprover togs vid studiens start och efter 72 timmar (n=199). CgA-nivåerna var förhöjda hos de flesta av patienterna vid studiens start. Patienterna med de högsta nivåerna av CgA vid studiens start samt 72 timmar senare hade sämre prognos och högre mortalitet. Risken att dö på sjukhuset ökade i proportion till nivåerna av CgA vid studiens start. De 135 personer som drabbades av septisk chock hade högre nivåer av CgA vid studiens start. Däremot sågs ingen skillnad i ökning av CgA-nivåer från studiens start till 72 timmar senare mellan dem som överlevde och dem som avled (Røsjø *et al.*, 2012).

Ytterligare en studie visade att CgA koncentrationer var en bra markör för tidig prognos hos allvarligt sjuka patienter. I den studien ingick 120 patienter med allvarliga sjukdomstillstånd och blodprover togs vid ankomst till sjukhuset. Ökade CgA koncentrationer var signifikant associerade med mortaliteten efter tre månader och omvänt relaterad till överlevnadstiden för patienterna (Zhang *et al.*, 2008).

Chromogranin A och hjärt-kärlsjukdom

En studie visade att plasma CgA-nivåer som tas inom ett dygn efter sjukhusankomst på grund av akut koronarkärlssyndrom är en oberoende prediktor för mortalitet. Patienter som hade höga nivåer av både CgA och pro-B-type natriuretic peptide (pro-BNP) associerades med sämre prognos. I uppföljningen, efter korrigering för konventionella riskfaktorer, sågs en association mellan höga nivåer av CgA och sjukhusvistelse på grund av hjärtsvikt. I den grupp där även vänstra kammarens slagvolym hade mätts, och korrigering för detta hade gjorts, fanns inte längre någon association mellan CgA-nivåer och hjärtsvikt. Detta kan bero på att denna grupp innehöll få individer, vilket gav den gruppen låg statistisk styrka, alternativt att systolisk dysfunktion är en mycket stark prediktor för hjärtsvikt. I studien ingick totalt 1268 personer med akut koronarkärlssyndrom (Jansson *et al.*, 2009).

Även Ceconi *et al* (2002) visade en association mellan nivåerna av CgA och mortalitet. Sannolikheten att en patient skulle överleva minskade med ökande CgA-nivåer. I den här modellen var CgA-nivåer den känsligaste prediktorn för mortalitet. CgA-nivåer var också relaterade till allvarlighetsgraden, där New York Heart Association-klass IV (NYHA-klass IV) hade de högsta nivåerna av CgA. Nivåerna kunde vara lika höga som tidigare studier visat hos

patienter med pheochromocytom och andra neuroendokrina tumörer. NYHA-klass I hade de signifikant lägsta nivåerna av CgA. I den här studien deltog endast ett fåtal symptomlösa individer, vilket gör att CgAs betydelse som prognostisk faktor hos asymptomatiska individer behöver utredas vidare. Totalt deltog 263 personer, varav 160 med kronisk hjärtsvikt.

Chromogranin A och neuroendokrin neoplas

En studie visade att individer med neuroendokrina tumörer eller kronisk atrofisk gastrit hade signifikant förhöjda nivåer av CgA i plasma. Däremot visade studien ingen skillnad i CgA-nivåer mellan personer med en neuroendokrin tumör och dem med kronisk atrofisk gastrit. Vid exkludering av de personer med neuroendokrin tumör, som vid provtagningstillfället var sjukdomsfria, sågs däremot signifikant högre nivåer av CgA hos personerna med en neuroendokrin tumör jämfört med personerna med kronisk atrofisk gastrit. Av personer med en neuroendokrin tumör hade de med metastasering högre nivåer av CgA jämfört med dem utan metastaser (Campana *et al.*, 2007). Även personer med neuroendokrina tumörer i pankreas (PNEN) hade signifikant högre nivåer av CgA om metastasering skett (Paik *et al.*, 2013).

Signifikanta skillnader i CgA koncentrationer har visats beroende på tumörens placering. Tumörer placerade i lungorna ledde till de lägsta uppmätta nivåerna av CgA i blod, medan patienter med Zollinger-Ellison syndrome (ZES) uppvisade de högsta värdena. Ingen signifikant skillnad i CgA koncentrationer sågs mellan tumörer placerade i pankreas, magsäck och tunntarm. I den här studien användes Chromogranin A ELISA kit⁵ och enligt studien bör ett cutoff-värde på 84–87 U/L (95 % specificitet, 55 % sensitivitet) användas för att urskilja patienter med neuroendokrin tumör från friska personer och personer med kronisk atrofisk gastrit (Campana *et al.*, 2007). I en annan studie hade samtliga elva personer med pheochromocytom förhöjda nivåer av CgA (O'Connor & Bernstein, 1984).

En studie visade att specifika sekretionsprodukter har högre specificitet än CgA koncentrationer när det gäller att differentiera mellan olika neuroendokrina tumörer. Däremot är CgA koncentrationer en bra markör för de neuroendokrina tumörer som inte har någon hormonproduktion eller där de nuvarande analysmetoderna har begränsningar, till exempel pheochromocytom (förhöjda nivåer av CgA i 89 % av fallen) och karcinoida tumörer (förhöjda CgA-nivåer i 80 % av fallen). I studien sågs också ett starkt positivt signifikant samband mellan tumörmassan och CgA-nivåer (Nobels *et al.*, 1997). Även O'Connor & Deftos (1987) såg höga nivåer av CgA vid karcinoida tumörer och en signifikant korrelation mellan CgA koncentrationer och tumörstorleken vid pheochromocytom.

En annan studie tittade på det diagnostiska värdet av CgA-nivåer för att differentiera en neuroendokrin tumör i pankreas (PNEN) från andra tumörer i pankreas. Studien visade ingen signifikant skillnad i CgA-nivåer mellan dessa två grupper. (Paik *et al.*, 2013).

⁵ DAKO A/S, Produktionsvej 42 DK-2600 Glostrup, Danmark

Chromogranin A och parodontit

I en fallkontrollstudie deltog 30 friska personer och 30 patienter med kronisk parodontit. En signifikant skillnad i nivåerna av CgA i både blod och saliv sågs mellan fall- och kontrollgruppen där fallgruppen hade högre nivåer av CgA. Ett signifikant samband mellan parodontit och individens psykosociala stressnivå påvisades, där fallgruppen hade högre poäng på "Holmes and Rahe stress scale" jämfört med kontrollgruppen (Reshma *et al.*, 2013). Hironaka *et al* (2008) såg en signifikant korrelation mellan allvarligt utbredd parodontit och förhöjda nivåer av CgA i saliv.

Chromogranin A och psykologisk stress

Studier har visat att CgA koncentrationer kan vara en indikator för psykologisk stress. Muntlig examination, bilkörning på motorvägen, ordbehandlingsprov samt skriftlig examination har visats öka nivåerna av CgA i saliv (Nakane *et al.*, 1998; Nakane *et al.*, 2002; Takatsuji *et al.*, 2008). Det tog längre tid för kortisolnivåerna att öka än för CgA-nivåerna. CgA-nivåerna var förhöjda strax innan presentationen respektive i mitten av bilkörningen, medan kortisolnivåerna var förhöjda först efter avslutad aktivitet (Nakane *et al.*, 1998). Kortisolnivåerna i en annan av studierna förblev oförändrade (Nakane *et al.*, 2002). I en studie där 20 män utsattes för ljud med 90 dB under 15 minuter sågs en signifikant ökning av nivåerna av CgA i saliv under dessa 15 minuter för att sedan sjunka igen. Det var stora individuella skillnader i nivåerna av CgA, vilket kan bero på deltagarnas olika känslighet för ljud (Miyakawa *et al.*, 2006). Däremot såg Ng *et al* (2003) ingen skillnad i nivåerna av CgA före och efter en skriftlig examination.

En studie har visat att basnivåerna av CgA inte alltid speglar nivåerna av kronisk stress och att mer generella förändringar av livsstil (till exempel förändring av matvanor och livsrytm) krävs för att nivåerna av CgA i saliv ska påverkas. Inget samband kunde ses mellan en enskild livsstilsfaktor och CgA-nivåer, däremot hade de äldre personerna (40–59 år), som hade en bättre livsstil vid tiden för studien jämfört med året innan, signifikant lägre nivåer av CgA, jämfört med de personer som hade samma eller en sämre livsstil (Toda *et al.*, 2005).

Andra orsaker till förhöjda nivåer av chromogranin A

En signifikant korrelation har påvisats mellan estimated glomerular filtration rate (eGFR) och plasma CgA-nivåer, vilket indikerar att njurfunktionen har en inverkan på CgA-nivåerna (Jansson *et al.*, 2009). Studier har också visat att CgA-nivåer i plasma är negativt korrelerade med GFR. CgA-nivåerna ökade allteftersom njurfunktionen minskade och ökningen var exponentiell (Hsiao *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 2009). En positiv korrelation har observerats mellan CgA-nivåer och kreatinin (Hsiao *et al.*, 1990; Nobels *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2008). Hsiao *et al* (1990) visade också i sin studie att etiologin bakom njursjukdomen inte påverkade CgA-nivåerna.

Behandling med protonpumpshämmare har resulterat i förhöjda nivåer av CgA (Waldum *et al.*, 1996; Sanduleanu *et al.*, 2001). Sanduleanu *et al* (2001) visade också i sin studie att ju längre behandlingstid, desto högre nivåer av CgA.

Även kronisk atrofisk gastrit har resulterat i förhöjda nivåer av CgA, dock inte lika höga som hos de individer som uppvisar symptom till följd av en neuroendokrin tumör. Av individerna med kronisk atrofisk gastrit hade de med hyperplasi signifikant högre nivåer av CgA jämfört med dem utan hyperplasi (Campana *et al.*, 2007).

Salivsammansättning

Salivutsöndringen styrs av det autonoma nervsystemet. Salivens basflöde stimuleras av det parasympatiska nervsystemet, medan det sympatiska nervsystemet kan öka salivflödet genom att inducera kontraktion av myoepiteliala celler (Wiggs & Lobprise, 1997).

De fyra spottkörtlarna som har störst betydelse när det gäller salivproduktionen hos hund är mandibular-, sublingual-, parotis- och zygomatikusspottkörteln. Mandibularspottkörteln har sin utförsgång under tungan och sublingualspottkörteln har sin utförsgång strax dorsalt om mandibularspottkörteln. Parotisspottkörteln har däremot sin utförsgång vid den fjärde övre premolaren, medan zygomatikusspottkörteln har sin största utförsgång kaudalt om den sista övre molaren (Wiggs & Lobprise, 1997). Till författarens kännedom finns det inte många beskrivande studier om spottkörtlarnas olika sekretion hos hund, men mandibularspottkörteln har en seromukös produktion, medan parotisspottkörteln har en serös produktion. Utöver dessa fyra finns det även flera små spottkörtlar belägna på olika platser i submukosan (Wiggs & Lobprise, 1997).

Människor saknar zygomatikusspottkörteln. De spottkörtlar som står för den största salivproduktionen är sublingual- och submandibularspottkörtlarna med en seromukös sekretion och parotisspottkörtlarna med en serös sekretion. Människor har också flera små spottkörtlar i munhållans submukosa och dessa har en mukös sekretion (Marino & Gorelick, 2005).

Salivsammansättningen hos hund är till författarens kännedom lite studerad. Lavy *et al* (2012) studerade salivsammansättningen hos taxar, jack russel och labrador retriever. Samtliga raser hade ett pH-värde på $8,53 \pm 0,34$ (jämfört med människor som har ett pH på 6,5–7,5). Saliven hos labrador retriever innehöll 40 % mer kalcium och 150 % mer fosfor jämfört med de andra två raserna. Däremot var buffertkapaciteten likvärdig mellan de tre raserna och signifikant högre än hos människor. Salivens innehåll av både kalcium, natrium och kalium var högre hos dessa tre raser, medan fosforinnehållet var signifikant lägre, jämfört med dem hos människor.

MATERIAL OCH METODER

Studien godkändes av Uppsala Djurförsöksetiska nämnd (nr C130772/13).

Utformning av salivinsamlingsmetod

I samtliga material förankrades en bit tandtråd som i sin tur förankrades till en peang för att förhindra hunden från att kunna svälja provmaterialet. Provmaterialet placerades buckalt på bägge sidor kaudalt om överkåkens fjärde premolar (P4) i munnen. Placeringen var densamma för alla metoder. För information om volymen saliv de olika materialen genererade – se under avsnittet ”Resultat”.

Salimetrics oral swab[®] (SOS)⁶

En 10 x 30 mm cylindrisk svabb som består av inert polymer, se figur 1.

Hunden som användes i detta försök var en jack russeltik. Hund och provtagare var välbekanta med varandra och försöket utfördes i hemmiljö. Försök gjordes med två svabbar där den ena placerades i munnen i 60 sekunder och den andra i 90 sekunder. Varje svabb placerades i var sitt 15 ml plaströr.⁷ Plaströren centrifugerades i 3300 rpm i 15 minuter på Klinisk Kemiska Laboratoriet, Universitetsdjursjukhuset, Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU), Uppsala.



Figur 1. *Salimetrics oral swab[®], material som testades vid utformning av salivinsamlingsmetod.*

Salimetrics oral swab[®] utan hölje

Utanpå Salimetrics oral swab[®] finns ett hölje av okänt, glatt material och för studier utan hölje togs cirka 75 % av detta bort. Försöket utfördes med samma hund och i samma miljö som tidigare. Den här gången placerades svabbarna 90 respektive 120 sekunder i munnen. Samma centrifugeringsinställningar som tidigare användes.

Bomullssvabb

Cirka 40 x 10 mm cylinderformad, består till 100 % av bomull, se figur 2.

⁶ Salimetrics, 101 Innovation Boulevard Suite 302, State college, PA 16803 USA

⁷ Sarstedt AB, Bergaliden 11, 252 23 Helsingborg

Försöket utfördes med samma hund och i samma miljö som tidigare. Svabbarna placerades 90 respektive 120 sekunder i munnen och centrifugerades som ovan.



Figur 2. Bomullssvabb, material som testades vid utformning av salivinsamlingsmetod.

Tvättork gasväv⁸

Cirka 50 mm i diameter, rund till formen, består till 100 % av bomull med en vikt på 23g/m^2 , se figur 3.

På grund av sin storlek placerades denna istället i munnen på en irländsk settertik, hund och provtagare var välbekanta med varandra och försöket skedde i hemmiljö. Den ena tvättorken placerades i munnen i 90 sekunder och den andra i 120 sekunder. Centrifugering skedde enligt tidigare beskrivning.



Figur 3. Tvättork, material som testades vid utformning av salivinsamlingsmetod.

Badsvamp⁹

En polyeterskum (polyeterpolyol) svamp med en densitet på 25 kg/m^3 , se figur 4.

⁸ Sterisets International BV, Ketelmeer 3, 5347 JX Oss, Nederländerna

⁹ Abena AB, Tolvmannavägen 1590 38 Kisa

Denna klipptes ner till önskad storlek, cirka 30 x 20 x 10 mm. I detta försök användes en beaglehanhund, hund och provtagare var inte välbekanta med varandra och försöket utfördes i kontorsmiljö. Polyeterskumsvampen placerades i munnen cirka tio sekunder och centrifugerades sedan i 3000 rpm i 15 minuter.

Då polyeterskumsvampen genererade störst volym saliv efter centrifugering blev det den som användes under resterande del av studien.



Figur 4. Tillklippt polyeterskumsvamp med fastsydd tandtråd, material som testades vid utformning av salivinsamlingsmetod.

Utvärdering av chromogranin A-nivåer i blod och saliv

I studien ingick fem treåriga beagletikar (i viktspannet 11,5–15,7 kg) utan kända sjukdomar. Samtliga är destinationsuppfödda försöksdjur på kliniska vetenskaper på SLU. De lever i grupp och fyra (hund 1, 2, 3 och 4) av dessa fem bor tillsammans. Provtagning utfördes fyra gånger per dag i tio dagar. Studien pågick den 16–20 och 23–27 september 2013. Under studien utförde samma personer, person A (PA) och person B (PB), samma uppgifter vid varje provtagningstillfälle. Undantag från detta var dag 3, provtagningstillfälle 2, där PB ersattes av person C (PC), samt dag 4, provtagningstillfällena 3 och 4, där PB ersattes av person D (PD).

Hundarna ingick även i tre studentövningar, se tabell 1.

Tabell 1. *De studentövningar varje hund deltog i*

Hund	Studentövning		
	Provtagning, läkemedelstillförsel	Reproduktion, digestion	Klinisk undersökning
1	Dag 1	Dag 5	-
2	Dag 1	Dag 5	-
3	Dag 1	Dag 5	-
4	Dag 1	-	Dag 10
5	-	Dag 3	-

I "Undersökning av reproduktions- och digestionsorgan" ingick bland annat vaginoskopering och bukpalpation och i "Provtagning och läkemedelstillförsel" ingick bland annat blodprovstagning och försök att lägga permanentkanyl. Dagen är den dag i ordningen från studiens start (dag 1) då respektive hund medverkade i en studentövning. Ett streck i kolumnen innebär att hunden aldrig deltog i den övningen.

Utformning av provtagning

Blod togs från vena cephalica och vid blodprovstagningen användes butterflynål med vakutainerhylsa¹⁰ och Vacuette® 2 ml Liteum-Heparinrör¹¹. Vid salivinsamlingen placerades en tillklippt polyeterskumsvamp i vardera kinden enligt tidigare beskrivning under 30 sekunder. Båda svamparna placerades sedan i samma 15 ml plaströr inför centrifugering.

Hundarna provtogs i samma ordning vid varje provtagningstillfälle, undantaget vid studentövningen dag 1, där proverna kom in allteftersom studenterna lyckades att ta blodprov eller lägga permanentkanyl, samt dag 5 där hund 4 och 5 provtogs först (då de andra hundarna var på studentövning). Tiden på dygnet när de olika aktiviteterna och provtagningarna skedde redovisas i tabell 2.

¹⁰ Becton Dickinson AB Box 47204, 100 74 Stockholm

¹¹ Greiner Bio-One GmbH, Maybachstrasse 2, 72636 Frickenhausen, Tyskland

Tabell 2. Hundarnas olika aktiviteter under dagen

Aktivitet	Klockslag
Första provtagning	6:30
Utfodring	8:00
Andra provtagning	8:15
Tredje provtagning	12:30
Skogspromenad	13:50-14:20
Studentövning	13:30- ca 15:00
Fjärde provtagning	14:30-ca 15:30

Tiderna ovan är ungefärliga då det kunde variera lite mellan dagarna. Varje dag deltog varje hund i antingen en studentövning eller fick gå en promenad. Undantag från detta var dag 1 där hund 5 varken fick en skogspromenad eller deltog i någon studentövning. Vid varje promenad användes samma promenadslinga och både person A och person B medverkade.

Efter observation av hundens beteende enligt ett beteendeprotokoll (se beskrivning för detta nedan) genomfördes först salivinsamlingen (PB tog provet, PA höll i hunden) och sedan blodprovet (PA tog provet, PB höll i hunden), undantaget dag 1, provtagningstillfälle 4, hund 1, 2, 3 och 4, där blodprovet togs av studenter före salivinsamlingen.

Blod och salivproverna förvarades i kylskåp fram till centrifugering (blodprover i 3300 rpm i fem minuter och salivprover i 3000 rpm i 15 minuter). Centrifugering av proverna från provtagningstillfälle 1 och 2 skedde på förmiddagen och proverna från provtagningstillfälle 3 och 4 centrifugerades på eftermiddagen. Efter centrifugering förflyttades polyeterskumsvamparna bort från plaströren och plaströren med salivinhåll placerades återigen i kylskåp. Plasman pipetterades över till 3 ml plaströr med kork och dessa placerades återigen i kylskåp. Efter att alla prover från dagen centrifugerats, placerades samtliga prover i -20°C . Samtliga rör förvarades stående. Följande dag packades de frysta proverna om och grupperades per dag och hund. De förvarades sedan i frysen fram till att analyserna utfördes.

Dag 1 kunde ingen centrifugering ske på Klinisk Kemiska Laboratoriet, en annan centrifug användes istället. Salivproverna från dag 5 placerades i -20°C först följande dag.

Utformande av beteendeprotokoll

I samband med provtagningarna dokumenterades hundarnas beteenden vid tre tillfällen: i samband med hämtning av hunden, under en kort promenad och under 15 sekunder efter att hunden placerats på undersökningsbordet. Ett beteendeprotokoll utformades för detta, se bilaga 1 (Keeling, L., professor i etologi och djurskydd på SLU, pers.medd., 2013-09-13).

Innan provtagningen hämtade PA hunden vid buren. Hunden fick sedan gå en kort promenad i koppel med PA. Vid provtagningarna före och efter utfodring samt efter promenad eller studentövning genomfördes den korta promenaden i hundarnas korridor inomhus. Vid provtagningen kl 12.30 (innan promenad eller studentövning) genomfördes den korta promenaden utomhus, från deras hundrastgård fram till ytterdörren till den byggnad där undersökningsrummet finns. Väl inne i provtagningsrummet lyfte PA upp hunden på undersökningsbordet genom att lyfta under magen och alltid ha hundens huvud vänt åt höger. När hunden var upplyft på bordet, tog PA ett steg bakåt och PB, som stod placerad cirka en meter från hundens huvudände, observerade hundens beteende på bordet under 15 sekunder. Om hunden satte sig ner under dessa 15 sekunder reste PA hunden till stående position maximalt två gånger för att övriga punkter i protokollet skulle kunna studeras. Om hunden under de 15 sekunderna satte sig ner en tredje gång, fick hunden förbli sittande.

Följande parametrar studerades och antecknades inför varje provtagning:

- Om hunden kom fram och hälsade eller inte, när PA närmade sig buren
- Antalet svansviftningar under den korta promenaden
- Hundens placering i förhållande till PA under den korta promenaden (framför, vid sidan, bakom eller om PA var tvungen att dra i kopplet för att få hunden att gå framåt)
- Tiden som den korta promenaden tog
- Hundens huvudposition på bordet (om det var horisontellt [hundens nos låg i linje med övre delen av scapula], över eller under denna nivå)
- Hundens pupiller (meios, normala eller mios)
- Om hunden slickade sig kring munnen (och i så fall hur många gånger) eller inte
- Om hunden lyfte på tassarna på samma plats eller inte
- Hundens kroppsposition (om hunden ville sitta, stå upp, ligga ner, gå runt och nosa eller klättra på PA eller PB)
- Om hunden krummade med ryggen eller inte
- Om hunden hade öronen vinklade platt bakåt eller inte
- Om hunden morrade, visade tänderna, nafsade eller reste ragg

Protokoll fördes för varje provtagningstillfälle innan blod och saliv samlades in, undantaget dag 1 när hund 1, 2, 3 och 4 var på studentövning. Vid detta tillfälle studerades hundarnas beteende endast när de befann sig på undersökningsbordet och inte under den korta promenaden.

Gruppering efter beteende

Utifrån beteendestudien valdes de parametrar som ansågs mest karakteristiska för att kunna gruppera hundarna i tre grupper utefter stressnivå: glad, stressad/rädd/nervös respektive arg hund (se tabell 3). För att hunden skulle tillhöra en grupp krävdes att hunden vid provtagningstillfället

uppvisade minst två av tre beteenden i den gruppen. För förklaring varför de andra beteendena från protokollet uteslöts – se under ”Diskussion”.

Tabell 3. *Indelning av hundarna i grupper utefter beteende*

Glad	Stressad/rädd/nervös	Arg
Kommer fram och hälsar vid ankomst till buren	Kommer inte fram och hälsar vid ankomst till buren	Morrar och visar tänderna vid ankomst till buren
Viftar på svansen	Viftar inte på svansen	Viftar långsamt eller inte alls med svansen, stel svans
Håller svansen upprätt eller horisontellt	Håller svansen nedsänkt eller mellan benen	Nafsar, reser ragg

Analys av blod- och salivprover

Analysen av blod- och salivproverna utfördes vid Klinisk kemi och farmakologi på Akademiska sjukhuset i Uppsala. Proverna transporterades dit med bil (bilfärden tog cirka tio minuter) och förvarades under transporten i frigolitlådor med is. Proverna analyserades under oktober månad med en competitive radioimmunoassay som mäter catestatindelen (humant CGA361-372) av CgA-molekylen (Stridsberg *et al.*, 2004). Metoden har validerats för hund (Stridsberg, M., M.D., Ph. D klinisk kemi, pers.medd., 2013). Saliv analyserades i enkelprover och plasma i dubbelprover.

Statistiska metoder

Nivåerna av CgA i plasma som funktion av nivåerna av CgA i saliv samt aktivitet, nivåerna av CgA i saliv som funktion av aktivitet samt nivåerna av CgA i plasma som funktion av aktivitet analyserades med hjälp av mixed linear models repeated-measures data (Littell *et al.*, 2006). Det statistiska datorprogram som användes var SAS 9,3¹². Dagarna betraktades som block (då alla hundar genomgick alla aktiviteter varje dag). Hund och hund * dag var de slumpmässiga faktorerna. Även nivåerna av CgA i saliv och plasma som funktion av hundarnas beteende analyserades, med samma slumpmässiga faktorer, men där beteende istället var den bestämda faktorn. Korrigering för multipla jämförelser gjordes enligt Tukey-Kramer. Pearson's korrelationskoefficient (r) användes för att analysera om det fanns någon korrelation mellan CgA-nivåer i blod och saliv, detta gjordes i statistikprogrammet Minitab 16¹³. $p < 0,05$ ansågs vara statistiskt signifikant.

¹² SAS Institute Inc, Cary, USA

¹³ Minitab Inc, Coventry, Storbritannien

RESULTAT

Genererad salivmängd med olika salivinsamlingsmetoder

Mängden saliv som genererades från de olika materialen redovisas i tabell 4. Användandet av polyeterskumsvamp i munhålan på hundarna resulterade i den största volymen saliv efter centrifugering.

Tabell 4. *Mängden saliv de olika salivinsamlingsmetoderna genererade*

Tid i munnen	Olika provmaterial				
	Salimetrix oral swab®	Salimetrix oral swab® utan hölje	Bomulls-svabb	Tvättork gasväv	Polyeter-skumsvamp
10 sek	-	-	-	-	1 ml
60 sek	0 ml	-	-	-	-
90 sek	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	-
120 sek	-	0,1 ml	0 ml	0,1 ml	-

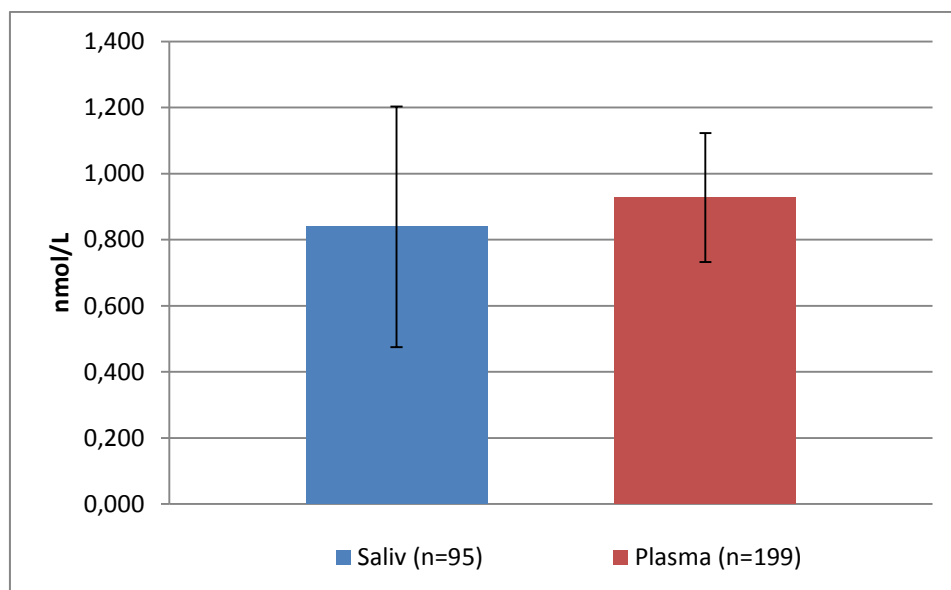
I de kolumner med ett streck utfördes inget försök.

Statistisk analys

Värdena uppvisade en normal distribution.

Chromogranin A-nivåer i blod och saliv

Medelvärde \pm standardavvikelse för nivåerna av CgA i plasma och saliv för hela studien var $0,93 \pm 0,20$ respektive $0,84 \pm 0,36$ nmol/L, se figur 5.



Figur 5. Medelvärde och standardavvikelse för chromogranin A koncentrationer för samtliga blod- och salivprover hos hund. Värdena är baserade på 199 plasmaprover och 95 salivprover.

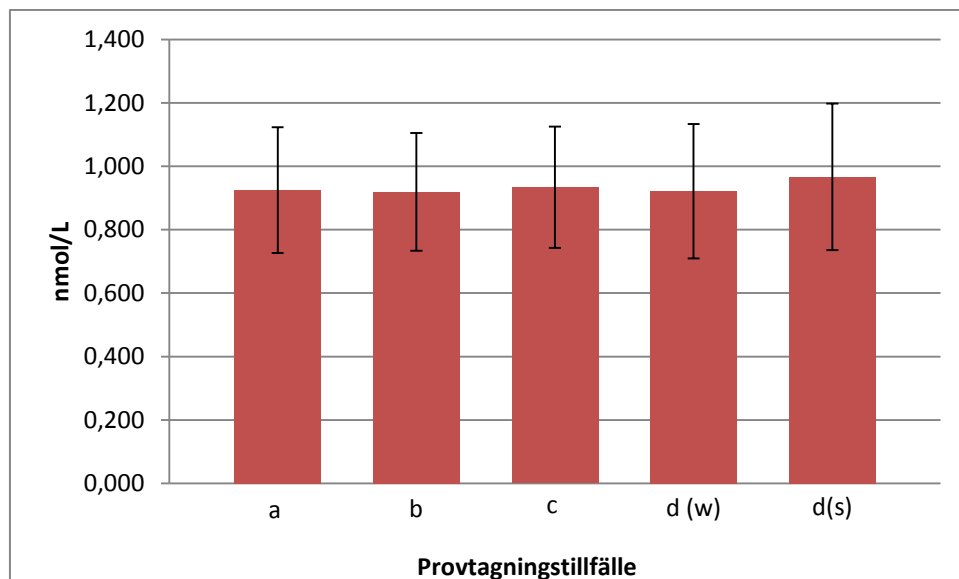
Nivåer av chromogranin A vid de olika provtagningsstillfällena

Medelvärde \pm standardavvikelse för CgA-nivåer i plasma och saliv vid de olika provtagningsstillfällena anges i tabell 5.

Tabell 5. Medelvärde \pm standardavvikelse för nivåerna av chromogranin A (CgA) i plasma och saliv hos hundar vid fem olika provtagningsstillfällen

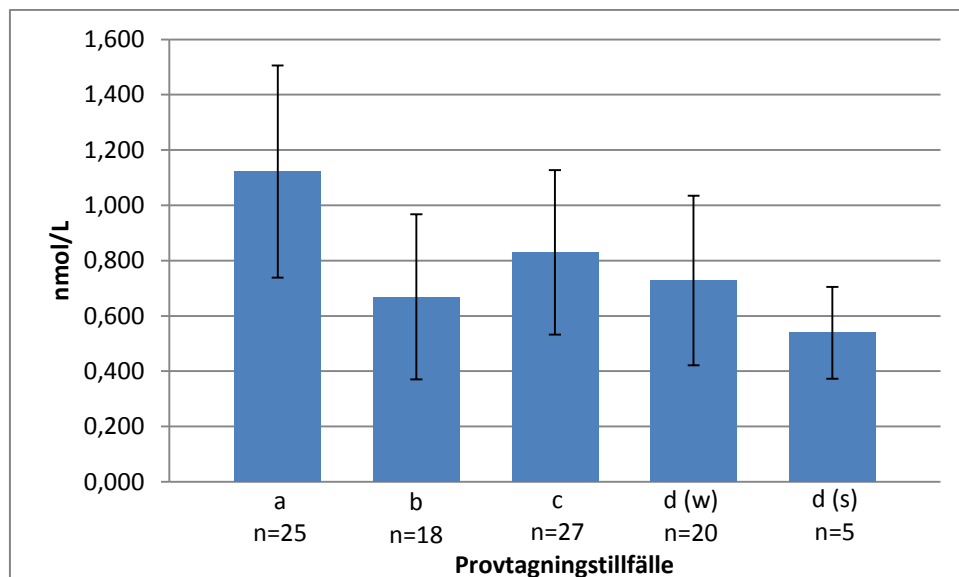
Provtagningsstillfälle	CgA i saliv (nmol/L)	CgA i plasma (nmol/L)	Antal prover
Innan utfodring	1,12 \pm 0,38	0,93 \pm 0,20	49 blod 25 saliv
Efter utfodring	0,67 \pm 0,30	0,92 \pm 0,19	50 blod 18 saliv
Innan promenad/studentövning	0,83 \pm 0,30	0,93 \pm 0,19	50 blod 27 saliv
Efter promenad	0,73 \pm 0,31	0,92 \pm 0,21	40 blod 20 saliv
Efter studentövning	0,54 \pm 0,17	0,97 \pm 0,23	9 blod 5 saliv

Inga signifikanta skillnader sågs mellan nivåerna av CgA i plasma och de olika provtagningsstillfällena ($p > 0,69$, analyserat med mixed linear models repeated-measures data), se figur 6.



Figur 6. Medelvärde och standardavvikelse för chromogranin A (CgA) koncentrationer för samtliga blodprover vid olika provtagningstillfällen hos hund. Inga signifikanta skillnader sågs mellan nivåerna av CgA och de olika provtagningstillfällena ($p > 0,69$, analyserat med mixed linear models repeated-measures data). Första provtagningen på morgonen (a), provtagning efter utfodring (b), provtagning innan promenad/studentövning (c), provtagning efter promenad (d(w)), provtagning efter studentövning (d(s)). Värdena är baserade på totalt 199 blodprover.

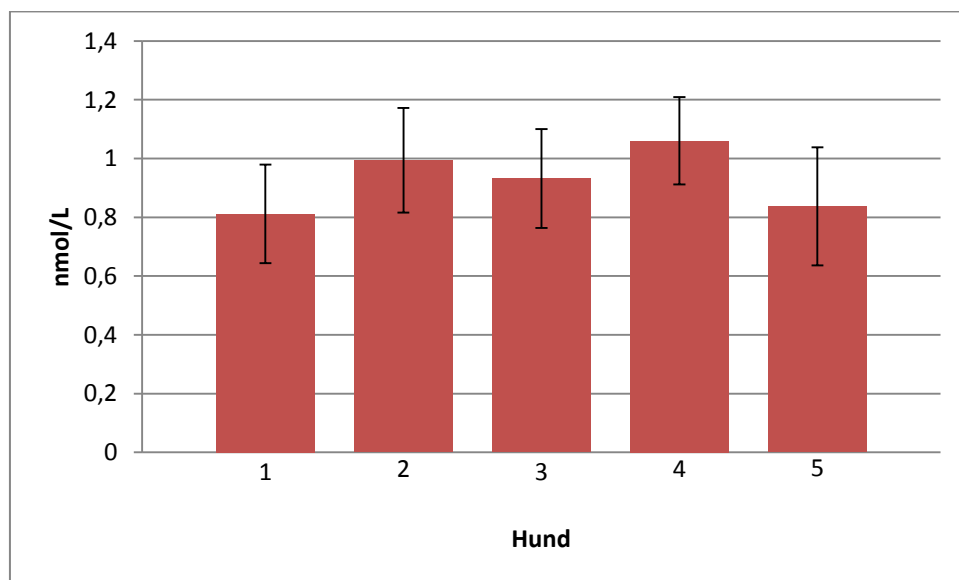
Däremot var CgA koncentrationerna i saliv signifikant högre vid första provtagningstillfället (på morgonen innan utfodring) jämfört med övriga provtagningstillfällen under dagen ($p < 0,008$, analyserat med mixed linear models repeated-measures data). Ingen signifikant skillnad i CgA-nivåer i saliv påvisades mellan övriga provtagningstillfällen ($p > 0,39$), se figur 7.



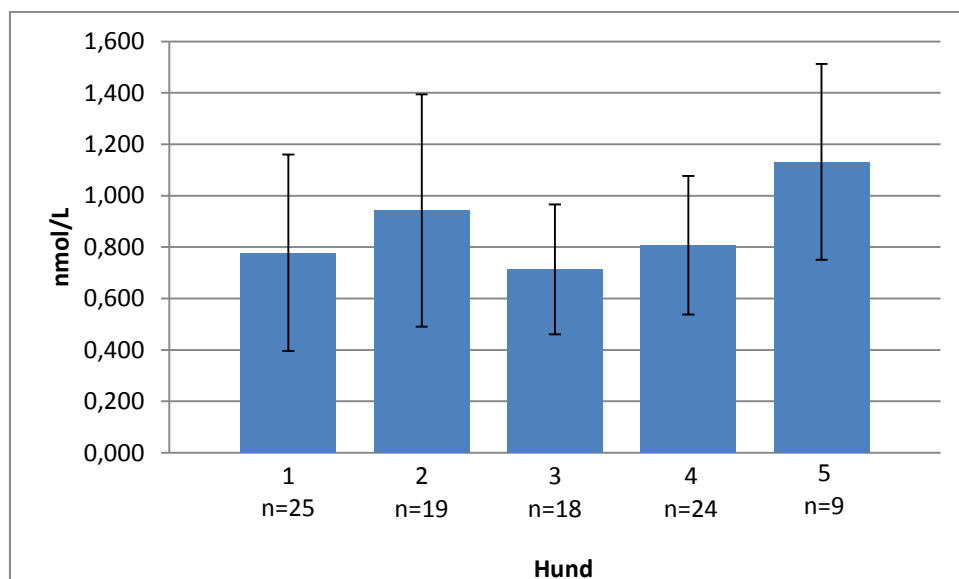
Figur 7. Medelvärde och standardavvikelse för chromogranin A (CgA) koncentrationer för samtliga salivprover vid olika provtagningstillfällen hos hund. CgA koncentrationerna i saliv var signifikant högre vid första provtagningen på morgonen jämfört med övriga provtagningstillfällen under dagen ($p < 0,008$, analyserat med mixed linear models repeated-measures data). Första provtagningen på morgonen (a), provtagning efter utfodring (b), provtagning innan promenad/studentövning (c), provtagning efter promenad (d(w)), provtagning efter studentövning (d(s)). n är antalet salivprover som togs vid varje provtagningstillfälle.

Individuell variation av chromogranin A

I figur 8 och 9 redovisas medelvärde och standardavvikelse för nivåerna av CgA i plasma och saliv för varje hund.



Figur 8. Medelvärde och standardavvikelse för chromogranin A koncentrationer i plasma för vardera hund. Värdena är baserade på totalt 199 plasmaprover.



Figur 9. Medelvärde och standardavvikelse för chromogranin A koncentrationer i saliv för vardera hund. n är antalet salivprover som tagits från varje hund.

Chromogranin A-nivåer och hundens olika beteenden

Hundarna grupperades in i tre grupper utefter beteende och medelvärde \pm standardavvikelse för CgA koncentrationerna i de olika grupperna redovisas i tabell 7.

Tabell 7. Medelvärde \pm standardavvikelse för nivåerna av chromogranin A (CgA) i plasma och saliv vid olika beteenden

Beteende	CgA i saliv (mmol/L)	CgA i plasma (mmol/L)	Antal prover
Glad	0,87 \pm 0,42	0,87 \pm 0,20	121 blod 56 saliv
Stressad/rädd/nervös	0,81 \pm 0,27	0,99 \pm 0,18	74 blod 36 saliv
Arg	-	-	0 blod 0 saliv

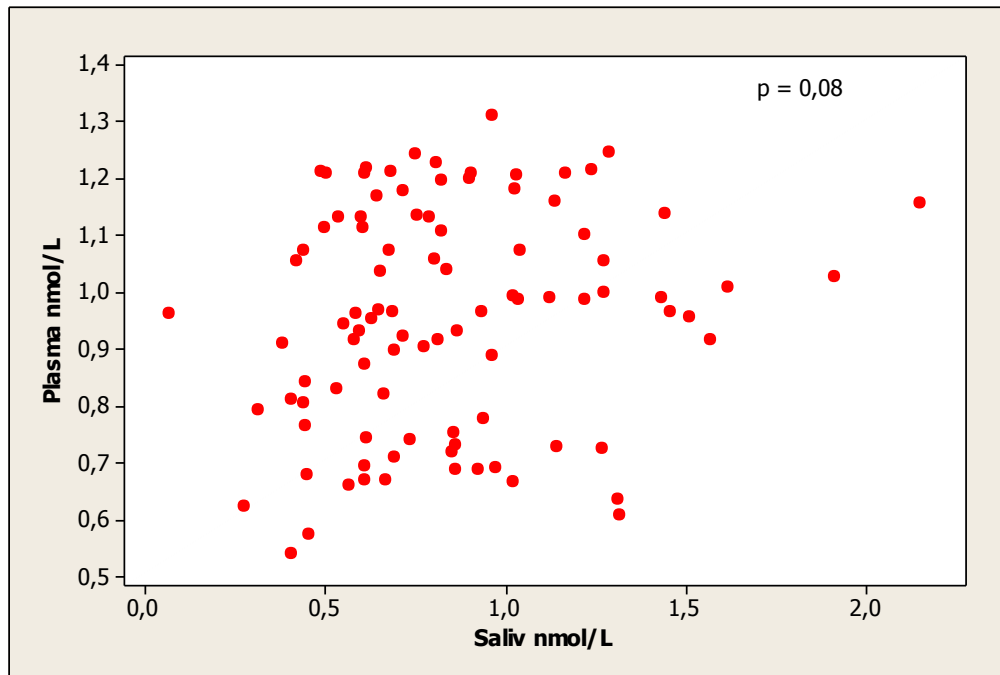
Inga av hundarna i studien uppvisade ett aggressivt beteende och därför finns det inte CgA-värden i denna grupp.

Inga signifikanta skillnader sågs i CgA-nivåer i plasma ($p = 0,75$) eller i saliv ($p = 0,69$) mellan gruppen glad hund och gruppen stressad/rädd/nervös hund (analyserat med mixed linear models repeated-measures data).

Under salivinsamlingen vände hundarna bort huvudet när polyeterskumsvamparna skulle föras in, försökte flytta på sig och spotta ut svabbarna. Under blodprovstagningen satt de relativt stilla.

Korrelation mellan chromogranin A-nivåer i blod och saliv

Korrelationen mellan CgA koncentrationer i plasma och saliv har baserats på 95 provpar då endast 95 av 200 (47,5 %) salivprover gick att analysera. Ingen signifikant korrelation påvisades mellan nivåerna av CgA i plasma och saliv ($p = 0,08$, analyserat med Pearson's korrelationskoefficient), se figur 10.



Figur 10. Ingen korrelation mellan nivåerna av chromogranin A i plasma och saliv kunde påvisas. Värdena är baserade på 95 provpar.

Ingen korrelation kunde heller påvisas mellan nivåerna av CgA i plasma och saliv vid respektive provtagningstillfälle ($p > 0,16$, analyserat med Pearson's korrelationskoefficient).

DISKUSSION

I vår studie sågs signifikant förhöjda nivåer av CgA i saliv vid första provtagningstillfället, innan utfodring. Inga signifikanta skillnader i CgA-nivåer i plasma mellan de olika provtagningstillfällena kunde påvisas. Ingen korrelation mellan nivåerna av CgA i plasma och saliv påvisades.

Utformning av beteendeprotokoll

Beteendeprotokollet utformades för att möjliggöra en gradering av hundens stressnivå, om den var glad, stressad/rädd/nervös eller arg. Avsikten var att se om det fanns några signifikanta skillnader i CgA koncentrationer beroende på hundens stressnivå. Avsikten var också att försöka definiera ett normalintervall eftersom CgA-nivåerna kan förväntas fluktuera under en hunds

normala aktiviteter. Denna information är väsentlig för vidare studier kring CgAs användbarhet som stressmarkör.

Det var svårt att bedöma pupillerna då ljuset varierade mellan de olika provtagningstillfällena. Även slickning kring munnen samt lyftande av tassar var svårbedömt, då olika studier visar på olika innebörd av detta beteende. En opublicerad studie som utfördes på SLU visade att hundar slickar sig kring munnen och lyfter på tassar vid positiva stimuli (Keeling, L., professor i etologi och djurskydd på SLU, pers.medd., 2013-09-13), medan Ottenheimer *et al* (2013) använde dessa beteenden som ett negativt tecken i sin studie. När det gäller huvudets nivå var även detta svårt att bedöma då hundarna under de 15 sekunder då de observerades, ofta hann ha huvudet i många olika positioner. Det skulle vara lättare att bedöma huvudposition om hundarna hade filmats, som gjordes i studien på SLU, då hade möjligheten funnits att gå tillbaka och studera de olika rörelserna igen. De djur som ingick i vår studie rastas normalt i flock och är ovana att gå i koppel, vilket försvårar bedömningen av relationen mellan hundens position under den korta promenaden och hundens stressnivå. Upprepade gånger var samma hund både framför, vid sidan och bakom PA under promenaden. För att minska risken för felgruppering användes endast de beteenden som ansågs ha en tydlig variation mellan en glad, en stressad/rädd/nervös och en arg hund. Gruppering av hundarna baserades därför på följande beteenden: om hunden kom fram och hälsade vid ankomst till buren eller inte, svansviftning eller inte, svansens position när hunden stod på undersökningsbordet samt om hunden morrade, visade tänder, nafsade eller reste ragg.

Salivinsamling

Salimetrics oral swab[®] (SOS) används på humansidan för salivinsamling. Anledningen till att höljet på SOS togs bort var för att se om detta skulle öka den salivabsorberande förmågan. Då höljet togs bort fick SOS en större absorberande förmåga, men genererade fortfarande en otillräcklig volym (endast 0,1 ml saliv efter centrifugering).

Då både tvättorken och bomullssvabben innehöll bomull kunde dessa inte användas för salivinsamling i denna studie eftersom CgA binder in till bomull. Polyeterskumsvampen bestod däremot endast av syntetiskt material och skall därför inte påverka analysen av CgA (Stridsberg, M., M.D., Ph. D klinisk kemi, pers.medd., 2013-09-10). Polyeterskumsvampen genererade dessutom störst mängd saliv efter centrifugering och valdes därför som salivinsamlingsmetod i resterande del av studien.

Att samla in saliv från hundarna visade sig vara svårt. Centrifugering av ett flertal prover resulterade i omätbara volymer av saliv. Vid analyserna visade det sig dessutom att vissa prover innehöll för mycket mukus, vilket omöjliggjorde analys av CgA (Stridsberg, M., M.D., Ph. D klinisk kemi, pers.medd., 2013-10-16). Detta resulterade i att endast 95 av 200 salivprover gick att analysera. Utifrån ovan nämnda problem kan slutsatsen dras att för salivinsamling på hund var detta inte en optimal metod. Det är möjligt att det hade gått att få ut mer saliv om svabbarna varit

placerade i munnen på hundarna under en längre tid. Dock kvarstår fortfarande problemet med för mycket mukus. Att använda denna metod är inte att rekommendera, då inte ens 50 % av proverna gick att analysera.

Det finns till författarens kännedom inte många beskrivande studier avseende salivsammanställning hos hund. Saliven från hundens olika spottkörtlar varierar i sammansättning och de olika spottkörtlarna mynnar på olika platser i munhålan (Wiggs & Lobprise, 1997). Placeringen av svabbarna i munnen i förhållande till de olika utförsgångarna borde således kunna resultera i olika salivsammanställning och därmed också ett varierande mukusinnehåll. Detta kan eventuellt påverka analysen av CgA då den saliv som innehåller för mycket mukus inte går att analysera. Valet av placering av polyeterskumsvampen i vår studie baserades dels på att placeringen skulle innebära en så liten stresspåverkan som möjligt för hunden och dels på att saliven skulle ha ett så lågt mukusinnehåll som möjligt. Polyeterskumsvampen placerades därför i höjd med fjärde premolaren, det vill säga där parotisspottkörteln (serös sekretion) och zygomatikusspottkörteln mynnar (Wiggs & Lobprise, 1997).

Flera studier hos människa och även en studie på hund har visat att frisättningen av CgA sker vid sympatikusstimulering (O'Connor & Bernstein, 1984; Takiyyuddin *et al.*, 1990; Cryer *et al.*, 1991; Kanno *et al.*, 1999; Akiyoshi *et al.*, 2005). Till följd av detta är det viktigt att salivinsamlingsmetoden ger en så liten stresspåverkan som möjligt. Placering av svabben under tungan istället, där mandibular- och sublingualspottkörteln mynnar (Wiggs & Lobprise, 1997), hade sannolikt inneburit ett större stressmoment för hunden.

Hundarna verkade uppleva salivinsamlingen som mer obehaglig än blodprovstagningen. Vid salivinsamlingen försökte de röra på huvudet, flytta på sig och spotta ut svabbarna, medan de under blodprovstagningen satt relativt stilla. Det tyder på att hundar upplever salivinsamling som ett större stressmoment än vad människor gör.

Korrelation mellan chromogranin A i plasma och saliv samt variation av chromogranin A över dygnet

Vår studie påvisade ingen korrelation mellan nivåerna av CgA i plasma och saliv, varken vid analys av alla 95 provparen eller vid analys av blod- och salivproverna vid respektive provtagningstillfälle. I vår studie sågs inte några signifikanta skillnader i CgA-nivåer i plasma mellan de olika provtagningstillfällena. Däremot kunde signifikant förhöjda CgA-nivåer i saliv vid första provtagningstillfället, före utfodring, påvisas. Inga signifikanta skillnader i CgA-nivåer i saliv sågs mellan övriga provtagningstillfällen under dagen.

Resultaten i vår studie stämmer väl överens med en tidigare studie på humansidan (Den *et al.*, 2006) där ingen korrelation mellan nivåerna av CgA i blod och saliv sågs. Detta kan bero på att CgA har olika sekretionsvägar i blod jämfört med i saliv (O'Connor & Frigon, 1984;

Takiyyuddin *et al.*, 1990; Saruta *et al.*, 2005). Att ingen korrelation sågs i vår studie kan också bero på att vi hade för få prover, då endast 95 av 200 salivprover gick att analysera. Till skillnad från vår studie kunde däremot Dag *et al* (2010) påvisa en korrelation mellan nivåerna av CgA i blod och saliv och Reshma *et al* (2013) såg inga signifikanta skillnader mellan nivåerna av CgA i blod och saliv. I studien av Den *et al* (2006), liksom i vår studie, sågs inte heller någon variation i plasmanivåerna, medan nivåerna av CgA i saliv uppvisade en variation. CgA-nivåerna var som högst på morgonen när individerna vaknade samt vid sista provtagningen på kvällen (kl 22:30). Även vår studie visade signifikant högre nivåer av CgA på morgonen. I vår studie avslutades provtagningen redan cirka kl 15:00–15:30, vilket gör att vi inte kan uttala oss om CgA-nivåerna under natten. I motsats till vår studie såg Kanai *et al* (2008) däremot inte någon variation av CgA-nivåerna i saliv under dygnet hos hund.

Det finns humana studier som har påvisat en variation i CgA-nivåer även i plasma under dygnet, med de lägsta nivåerna på morgonen (Takiyyuddin *et al.*, 1991; Giampaolo *et al.*, 2002). Hos hundar har däremot ingen variation av CgA koncentrationer i blod påvisats (Akiyoshi *et al.*, 2005), vilket är i linje med resultaten av vår studie.

Individuell variation av chromogranin A

Resultaten i vår studie tyder på att CgA-nivåer i plasma är relativt stabila mellan individer, medan CgA-nivåer i saliv visar en större individuell variation. I vår studie ingick endast fem hundar och en större studie krävs för att uttala sig om huruvida det finns en individuell variation av CgA-nivåer.

Chromogranin A-nivåer och olika beteenden

Hundarna delades in i tre olika grupper utefter beteende (som beskrivits ovan under rubriken ”Utformande av beteendeprotokoll”): glad hund, stressad/rädd/nervös hund och arg hund. I vår studie uppfyllde inga av hundarna kriterierna för gruppen arg hund och därför saknar denna grupp CgA-värden. Från det material vi har ser det inte ut att vara några större skillnader i CgA-nivåer mellan gruppen glad hund och gruppen stressad/rädd/nervös hund. Det här är dock en pilotstudie och det behövs en större utredning med fler prover för att uttala sig om hur lindrig-moderat stress inverkar på CgA-nivåer.

Chromogranin A-nivåer och stress

Olika studier har visat på olika resultat när det gäller hur psykisk stress påverkar CgA-nivåerna. Upplevelsen av stress är individuell och det kan vara svårt att kvantifiera och sätta i relation till olika markörer. Flera av studierna på humansidan har visat att psykologisk stress leder till förhöjda nivåer av CgA i saliv (Nakane *et al.*, 1998; Nakane *et al.*, 2002; Miyakawa *et al.*, 2006; Takatsuji *et al.*, 2008). Det finns även en humanstudie där inga skillnader i CgA-nivåer sågs (Ng *et al.*, 2003), vilket är i linje med vår studie där inga skillnader i CgA-nivåer mellan de aktiviteter

som förväntades upplevas som positiva (utfodring, promenader) och de aktiviteter som förväntades upplevas som negativa (studentövningar) kunde påvisas. Både Takiyyuddin *et al* (1990) och Cryer *et al* (1991) visade i sina humanstudier att nivåerna av CgA inte var någon tillförlitlig stressmarkör vid fysiologiska förhållanden, vilket *kan* ha varit fallet i vår studie. Det är också *möjligt* att studentövningarna inte innebar en tillräckligt hög stressnivå för hundarna. Dock är det omöjligt för oss att uttala oss om detta på grund av för få prover (endast fem salivprover) och på grund av det lilla materialet utfördes inga fortsatta statistiska analyser. Inte heller CgA-nivåerna i plasma visade några signifikanta skillnader mellan de olika aktiviteterna. I vår studie analyserades nio plasmaprover tagna efter studentövning, vilket också är för få prover och därmed gör det omöjligt för oss att uttala oss om detta. Vidare studier krävs för att se om CgA-nivåer varierar mellan olika aktiviteter hos hund.

En humanstudie visade att nivåerna av CgA i blod var signifikant förhöjda direkt efter en avslutad skogspromenad (Toda *et al.*, 2013). I vår studie sågs däremot inga signifikanta skillnader i CgA-nivåer i varken blod eller saliv före, respektive efter, en skogspromenad.

Chromogranin A som prognostisk biomarkör

En prognostisk biomarkör ska kunna skilja ut sjuka djur med sämre prognos inför behandling. Den får inte variera för mycket i nivåer hos friska individer och det måste gå att upptäcka en tydlig ökning eller sänkning i nivåer hos sjuka djur jämfört med nivån hos friska. Hos människor med allvarliga hjärtsjukdomar, djupa brännskador, endokrina tumörer och andra allvarliga sjukdomstillstånd har CgA koncentrationer visat sig vara en bra indikator för mortalitet och prognos (Ceconi *et al.*, 2002; Campana *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Jansson *et al.*, 2009; Røsjø *et al.*, 2012; Lindahl *et al.*, 2013). Hur nivåerna av CgA varierar hos svårt sjuka djur vet vi ännu inte, för detta krävs vidare studier.

CgA-nivåerna har på humansidan visat sig variera mellan många olika situationer, såsom psykologisk stress (Nakane *et al.*, 1998; Nakane *et al* 2002; Miyakawa *et al.*, 2006; Takatsuji *et al.*, 2008), kort respektive lång intensiv träning (Takiyyuddin *et al.*, 1990; Nakane *et al.*, 1998; Nickel *et al.*, 2012; Røsjø *et al.*, 2013) och även av en skogspromenad (Toda *et al.*, 2013). Däremot skiljer sig resultaten en del mellan studierna. Detta kan bero på att det finns en stor fysiologisk variation av CgA-nivåer i blod och saliv på humansidan. I vår studie utsattes hundarna för stress och vardagliga sysslor, men inga signifikanta skillnader i CgA-nivåer sågs efter dessa aktiviteter jämfört med innan. Detta torde vara en positiv sak för CgA som biomarkör och indikerar att normalvariationen under dygnet inte är lika stor hos hundar som hos människor.

Vår pilotstudie har visat att CgA koncentrationerna i plasma är relativt stabila under dygnet och att det som kan kallas för normal stress i vardagen inte påverkar frisättningen av CgA. Nästa steg blir att mäta CgA-nivåer hos svårt sjuka djur och hos djur med smärta för att vidare utreda om analys av CgA koncentrationer kan vara användbar som markör för smärta, morbiditet och

mortalitet hos hundar. Detta för att kunna undvika onödigt lidande i form av behandlingar som ändå inte kommer att påverka hundens livslängd.

TACK

Tack till Thanikul Srithunyarat för gott samarbete och kamratskap, till Mats Stridsberg för hjälp med analyserna av CgA koncentrationer, till Ulf Olsson för hjälp med statistisk bearbetning och till Emma Hörnebro för tillhandahållande av beaglarna.

REFERENSER

- Akiyoshi, H., Aoki, M., Shimada, T., Noda, K., Kumagai, D., Saleh, N., Sugii, S., Ohashi, F. (2005). Measurement of plasma chromogranin A concentrations for assessment of stress responses in dogs with insulin-induced hypoglycemia. *American Journal of Veterinary Research*, 66 (10), ss. 1830-1835.
- Banks, P., Helle, K. (1965). The Release of Protein from the Stimulated Adrenal Medulla. *Biochemical Journal*, 97 (3), ss. 40C-41C.
- Campana, D., Nori, F., Piscitelli, L., Morselli-Labate, A.M., Pezzilli, R., Corinaldesi, R., Tomassetti, P. (2007). Chromogranin A: Is It a Useful Marker of Neuroendocrine Tumors?. *Journal of Clinical Oncology*, 25 (15), ss. 1967-1973.
- Ceconi, C., Ferrari, R., Bachetti, T., Opasich, C., Volterrani, M., Colombo, B., Parrinello, G., Corti, A. (2002). Chromogranin A in heart failure, a novel neurohumoral factor and a predictor for mortality. *European Heart Journal*, 23, ss. 967-974.
- Chen, Y., Mahata, M., Rao, F., Khandrika, S., Courel, M., Fung, M., Zahng, K., Stridsberg, M., Ziegler, M., Hamilton, B., Lipkowitz, M., Taupenot, L., Nievergelt, C., Mahata, S., O'Connor, D. (2009). Chromogranin A Regulates Renal Function by Triggering Weibel-Palade Body Exocytosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20 (7), ss. 1623-1632.
- Cryer, P.E., Wortsman, J., Shah, S.H., Nowak, R.M., Deftos, L.J. (1991). Plasma chromogranin A as a marker of sympathochromaffin activity in humans. *American Journal of Physiology*, 260 (2 pt 1), ss. E243-246.
- Dag, E., Aydin, S., Ozkan, Y., Erman, F., Ferda Dagli, A., Gurger, M. (2010). Alteration in chromogranin A, obestatin and total ghrelin levels of saliva and serum in epilepsy cases. *Peptides*, 31, ss. 932-937.
- Den, R., Toda, M., Nagasawa, S., Kitamura, K., Morimoto, K. (2007). Circadian rhythm of human salivary chromogranin A. *Biomedical Research*, 28 (1), ss. 57-60.
- Doss, J.C., Grone, A., Capen, C.C., Rosol, T.J. (1998). Immunohistochemical localization of chromogranin A in endocrine tissues and endocrine tumors in dogs. *Veterinary Pathology*, 35, ss. 312-315.
- Ehlert, U., Straub, R. (1998). Physiological and emotional response to psychological stressors in psychiatric and psychosomatic disorders. *Annals of the New York Academy of Science*, 851, ss. 477-486.
- Esler, M., Jackman, G., Leonard, P., Skews, H., Bobik, A., Korner, P. (1981). Effect of norepinephrine uptake blockers on norepinephrine kinetics. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 29, ss. 12-20.

- Giampaolo, B., Angelica, M., Antonio, S. (2002). Chromogranin A in normal subjects, essential hypertensives and adrenalectomized patients. *Clinical Endocrinology (Oxf)*, 57 (1), ss. 41-50.
- Hironaka, M., Ansai, T., Soh, I., Ishisaka, A., Awano, S., Yoshida, A., Hamasaki, T., Sonoki, K., Takata, Y., Takehara, T. (2008). Association between salivary levels of chromogranin A and periodontitis in older Japanese. *Biomedical Research*, 29 (3), ss. 125-130.
- Hsiao, R.J., Mezger, M.S., O'Connor, D.T. (1990). Chromogranin A in uremia: Progressive retention of immunoreactive fragments. *Kidney International*, 37, ss. 955-964.
- Jansson, A.M., Røsjø, H., Omland, T., Karlsson, T., Hartford, M., Flyvbjerg, A., Caidahl, K. (2009). Prognostic value of circulating chromogranin A levels in acute coronary syndromes. *European Heart Journal*, 30, ss. 25-32.
- Kanai, K., Hino, M., Hori, Y., Nakao, R., Hoshi, F., Itoh, N., Higuchi, S. (2008). Circadian variations in salivary chromogranin a concentrations during a 24-hour period in dogs. *Journal of Veterinary Science*, 9 (4), ss. 421-423.
- Kanno, T., Asada, N., Yanase, H., Iwanaga, T., Ozaki, T., Nishikawa, Y., Iguchi, K., Mochizuki, T., Hoshino, M., Yanaihara, N. (1999). Salivary secretion of highly concentrated chromogranin a in response to noradrenalin and acetylcholine in isolated and perfused rat mandibular glands. *Experimental Physiology*, 84, ss. 1073-1083.
- Lavy, E., Goldberger, D., Friedman, M., Steinberg, D. (2012). pH values and mineral content of saliva in different breeds of dogs. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 67 (4), ss. 244-248.
- Lindahl, A.E., Low, A., Stridsberg, M., Sjöberg, F., Ekselius, L., Gerdin, B. (2013). Plasma chromogranin A after severe burn trauma. *Neuropeptides*, 47, ss. 207-212.
- Littell, R.C., Milliken, G.A., Stroup, W.W., Wolfinger, R.D., Schabenberger, O. (2006). SAS for Mixed Models. 2. uppl. Cary NC, USA. SAS Institute Inc.
- Marino, C.R., Gorelick, F.S. (2005). Pancreatic and Salivary glands. I: W.F. Baron & E.L. Boulpaep (red). *Medical Physiology*. Philadelphia: Elsevier Saunders, ss. 926-930.
- Miyakawa, M., Matsui, T., Kishikawa, H., Murayama, R., Uchiyama, I., Itoh, T., Yoshida, T. (2006). Salivary chromogran A as a measure of stress response to noise. *Noise and Health*, 8 (32), ss. 108-113.
- Nakane, H., Asami, O., Yamada, Y., Harada, T., Matsui, N., Kanno, T., Yanaihara, N. (1998). Salivary chromogranin A as an index of psychosomatic stress response. *Biomedical Research*, 19 (6), ss. 401-406.
- Nakane, H., Asami, O., Yamada, Y., Ohira, H. (2002). Effect of negative air ions on computer operation, anxiety and salivary chromogranin A-like immunoreactivity. *International Journal of Psychophysiology*, 46 (1), ss. 85-89.
- Ng, V., Koh, D., Mok, B., Chia, S.E., Lim, L.P. (2003). Salivary Biomarkers Associated with Academic Assessment Stress Among Dental Undergrads. *Journal of Dental Education*, 67 (10), ss. 1091-1094.
- Nickel, T., Vogeser, M., Emslander, I., David, R., Heilmeier, B., op den Winkel, M., Schmidt-Truckäss, A., Wilbert-Lampen, U., Hanssen, H., Halle, M. (2012). Extreme exercise enhances chromogranin A levels correlating with stress levels but not with cardiac burden. *Atherosclerosis*, 220, ss. 219-222.

- Nobels, F.R.E, Kwekkeboom, D.J., Coopmans, W., Schoenmakers, C.H.H., Lindemans, J., W De Herder, W., Krenning, E.P., Bouillon, R., Lamberts, S.W.J. (1997). Chromogranin A as Serum Marker for Neuroendocrine Neoplasia: Comparison with Neuron-Specific Enolase and the α -Subunit of Glycoprotein Hormones. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82 (8), ss. 2622-2628.
- O'Connor, D.T., Frigon, R.P., Sokoloff, R.L. (1984). Human chromogranin A purification and characterization from catecholamine storage vesicles of human pheochromocytoma. *Hypertension*, 6 (1), ss. 2-12.
- O'Connor, D.T., Frigon, R.P. (1984). Chromogranin A, the major catecholamine storage vesicle soluble protein. Multiple size, forms, subcellular storage, and regional distribution in chromaffin and nervous tissue elucidated by radioimmunoassay. *The Journal of Biological Chemistry*, 259, ss. 3237-3247.
- O'Connor, D.T., Bernstein, K.N. (1984). Radioimmunoassay of Chromogranin A in plasma as a measure of exocytotic sympathoadrenal activity in normal subjects and patients with pheochromocytoma. *The New England Journal of Medicine*, 311 (12), ss. 764-770.
- O'Connor, D.T., Deftos, L.J. (1987). How sensitive and specific is measurement of plasma Chromogranin A for the diagnosis of neuroendocrine neoplasia?. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 493, ss. 379-386.
- Ottenheimer Carrier, L., Cyr, A., Anderson, R.E., Walsh, C.J. (2013). Exploring the dog park: Relationship between social behaviours, personality and cortisol in companion dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 146, ss. 96-106.
- Paik, W.H., Ryu, J.K., Song, B.J., Kim, J., Park, J.K., Kim, Y.T., Yoon, Y.B. (2013). Clinical Usefulness of Plasma Chromogranin A in Pancreatic Neuroendocrine Neoplasm. *Journal of Korean Medical Science*, 28, ss. 750-754.
- Reshma, A.P., Arunachalam, R., Pillai, J.K., Kurra, S.B., Varkey, V.K., Prince, M.J. (2013). Chromogranin A: Novel biomarker between periodontal disease and psychosocial stress. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 17 (2), ss. 214-218.
- Røsjø, H., Nygård, S., Kaukonen, K-M., Karlsson, S., Stridsberg, M., Ruokonen, E., Pettilä, V., Omland, T. (2012). Prognostic value of chromogranin A in severe sepsis: data from the FINNSEPSIS study. *Intensive Care Medicine*, 38, ss. 820-829.
- Røsjø, H., Opstad, P.K., Hoff, J.E., Godang, K., Christensen, G., Stridsberg, M., Omland, T. (2013). Effect of short- and long-term activities on circulating granin protein levels. *Regulatory Peptides*, 185, ss. 14-19.
- Sanduleanu, S., De Bruïne, A., Stridsberg, M., Jonkers, D., Biemond, I., Hameeteman, W., Lundqvist, G., Stockbrügger, R.W. (2001). Serum chromogranin A as a screening test for gastric enterochromaffin-like cell hyperplasia during acid-suppressive therapy. *European Journal of Clinical Investigation*, 31, ss. 802-811.
- Saruta, J., Tsukinoki, K., Sasaguri, K., Ishii, H., Yasuda, M., Osamura, Y.R., Watanabe, Y., Sato, S. (2005). Expression and Localization of Chromogranin A Gene and Protein in Human Submandibular Gland. *Cells Tissues Organs*, 180, ss. 237-244.
- Smith, W.J., Kirshner, N. (1967). A Specific Soluble Protein from the Catecholamine Storage Vesicles of Bovine Adrenal Medulla I. Purification and chemical characterization. *Molecular Pharmacology*, 3 (1), ss. 52-62.

- Stridsberg, M., Eriksson, B., Öberg, K., Janson E.T. (2003). A comparison between three commercial kits for chromogranin A measurements. *Journal of Endocrinology*, 177, ss. 337-341.
- Stridsberg, M., Eriksson, B., Öberg, K., Janson, E.T. (2004). A panel of 11 region-specific radioimmunoassays for measurements of human chromogranin A. *Regulatory Peptides*, 117, ss. 219-227.
- Takiyyuddin, M.A., Cervenka, J.H., Sullivan, P.A., Pandian, M.R., Parmer, R.J., Barbosa, J.A., O'Connor D.T. (1990). Is physiologic sympathoadrenal catecholamine release exocytotic in humans?. *Circulation*, 81, ss. 185-195.
- Takiyyuddin, M.A., Neuman, H.P.H., Cervenka, J.H., Kennedy, B., Dinh, T.Q., Ziegler, M.G., Baron, A.D., O'Connor, D.T. (1991). Ultradian variations of chromogranin A in humans. *American Journal of Physiology*, 261, ss. R939-944.
- Takatsuji, K., Sugimoto, Y., Ishizaki, S., Ozaki, Y., Matsuyama, E., Yamaguchi, Y. (2008). The effects of examination stress on salivary cortisol, immunoglobulin A, and chromogranin A in nursing students. *Biomedical Research*, 29 (4), ss. 221-224.
- Toda, M., Den, R., Hasegawa-Ohira, M., Morimoto, K. (2013). Effects of woodland walking on salivary stress markers cortisol and chromogranin A. *Complementary Therapies in Medicine*, 21, ss. 29-34.
- Toda, M., Den, R., Nagasawa, S., Kitamura, K., Morimoto, K. (2005). Relationship Between Lifestyle Scores and Salivary Stress Markers Cortisol and Chromogranin A. *Archives of Environmental & Occupational Health*, 60 (5), ss. 266-269.
- Waldum, H.L., Arnestad, J.S., Brenna, E., Eide, I., Syversen, U., Sandvik, A.K. (1996). Marked increase in gastric acid secretory capacity after omeprazole treatment. *Gut*, 39, ss. 649-653.
- Wiggs, R.B., Lobprise, H.B. (1997). *Veterinary Dentistry: principles & practice*. Philadelphia. Lippincott-Raven Publishers. ss. 81-85.
- Zhang, D., Lavaux, T., Voegeli, A-C., Lavigne, T., Castelain, V., Meyer, N., Sapin, R., Aunis, D., Metz-Boutigue, M-H., Schneider, F. (2008). Prognostic Value of Chromogranin A at Admission in Critically Ill Patients: A Cohort Study in a Medical Intensive Care Unit. *Clinical Chemistry*, 54 (9), ss. 1497-1503.

BILAGA 1 Beteendeprotokoll
Måndag 16:e september, dag 1 Promenad/övning kl:

ID	Saliv	Blod	Bur	Promenad		Ståendes på undersökningsbordet								Övriga anteckningar
			Vill hälsa	Placering	Svans-viftning	Huvud	Svans	Pupill	Slick	Tass	Position	Rygg	Öron	
0101a			J/N	F/Br/B/D	J/N ...	U/H/N	U/H/N	Me/N/Mi	J/N ...	J/N ...	St/Si/L/G/K	J/N	J/N	
0102a			J/N	F/Br/B/D	J/N ...	U/H/N	U/H/N	Me/N/Mi	J/N ...	J/N ...	S/Si/L/G/K	J/N	J/N	
0103a			J/N	F/Br/B/D	J/N ...	U/H/N	U/H/N	Me/N/Mi	J/N ...	J/N ...	St/Si/L/G/K	J/N	J/N	
0104a			J/N	F/Br/B/D	J/N ...	U/H/N	U/H/N	Me/N/Mi	J/N ...	J/N ...	St/Si/L/G/K	J/N	J/N	
0105a			J/N	F/Br/B/D	J/N ...	U/H/N	U/H/N	Me/N/Mi	J/N ...	J/N ...	St/Si/L/G/K	J/N	J/N	
0101b			J/N	F/Br/B/D	J/N ...	U/H/N	U/H/N	Me/N/Mi	J/N ...	J/N ...	St/Si/L/G/K	J/N	J/N	
0102b			J/N	F/Br/B/D	J/N ...	U/H/N	U/H/N	Me/N/Mi	J/N ...	J/N ...	St/Si/L/G/K	J/N	J/N	
0103b			J/N	F/Br/B/D	J/N ...	U/H/N	U/H/N	Me/N/Mi	J/N ...	J/N ...	St/Si/L/G/K	J/N	J/N	
0104b			J/N	F/Br/B/D	J/N ...	U/H/N	U/H/N	Me/N/Mi	J/N ...	J/N ...	St/Si/L/G/K	J/N	J/N	
0105b			J/N	F/Br/B/D	J/N ...	U/H/N	U/H/N	Me/N/Mi	J/N ...	J/N ...	St/Si/L/G/K	J/N	J/N	
0101c			J/N	F/Br/B/D	J/N ...	U/H/N	U/H/N	Me/N/Mi	J/N ...	J/N ...	St/Si/L/G/K	J/N	J/N	
0102c			J/N	F/Br/B/D	J/N ...	U/H/N	U/H/N	Me/N/Mi	J/N ...	J/N ...	St/Si/L/G/K	J/N	J/N	
0103c			J/N	F/Br/B/D	J/N ...	U/H/N	U/H/N	Me/N/Mi	J/N ...	J/N ...	St/Si/L/G/K	J/N	J/N	
0104c			J/N	F/Br/B/D	J/N ...	U/H/N	U/H/N	Me/N/Mi	J/N ...	J/N ...	St/Si/L/G/K	J/N	J/N	
0105c			J/N	F/Br/B/D	J/N ...	U/H/N	U/H/N	Me/N/Mi	J/N ...	J/N ...	St/Si/L/G/K	J/N	J/N	
0101d			J/N	F/Br/B/D	J/N ...	U/H/N	U/H/N	Me/N/Mi	J/N ...	J/N ...	St/Si/L/G/K	J/N	J/N	
0102d			J/N	F/Br/B/D	J/N ...	U/H/N	U/H/N	Me/N/Mi	J/N ...	J/N ...	St/Si/L/G/K	J/N	J/N	
0103d			J/N	F/Br/B/D	J/N ...	U/H/N	U/H/N	Me/N/Mi	J/N ...	J/N ...	St/Si/L/G/K	J/N	J/N	
0104d			J/N	F/Br/B/D	J/N ...	U/H/N	U/H/N	Me/N/Mi	J/N ...	J/N ...	St/Si/L/G/K	J/N	J/N	
0105d			J/N	F/Br/B/D	J/N ...	U/H/N	U/H/N	Me/N/Mi	J/N ...	J/N ...	St/Si/L/G/K	J/N	J/N	

Förklaringar till ovan

Bur: kommer fram och hälsar när person A närmar sig buren (Ja/Nej)

Promenad: placering: hundens placering i förhållande till person A (Framför/Bredvid/Bakom/Dra), svansviftning: Ja/Nej antal

Ståendes på bordet: huvud: huvudposition (Upp/Horisontell/Ner, där horisontell är rak linje från nos till övre scapula), svans: svansposition (Upp/Horisontell/Ner, där horisontell är rak linje från hundens rygg), pupill: hundens pupiller (Meios/Normal/Mios), slick: slickar sig kring munnen (Ja/Nej antal), tass: lyfter tassarna (Ja/Nej antal), position: kroppsposition (Står/Sitter/Ligger/Går runt/klättrar på person A eller B), rygg: kutar rygg (Ja/Nej), öron: öronen rakt bakåt längs med huvudet (Ja/Nej)